

**WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM**  
Internationales Büro

**INTERNATIONALES BÜRO  
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)**

<p>(51) Internationale Patentklassifikation 6 :  <b>A61K 38/44, A23L 1/015</b></p>	<p><b>A1</b></p>	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 96/14083</b></p> <p>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: <b>17. Mai 1996 (17.05.96)</b></p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: <b>PCT/EP95/04352</b></p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: <b>6. November 1995 (06.11.95)</b></p> <p>(30) Prioritätsdaten:  <b>94117409.6</b>      <b>4. November 1994 (04.11.94)</b>      <b>EP</b></p> <p>(34) Länder für die die regionale oder internationale Anmeldung eingereicht worden ist: <b>DE usw.</b></p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):  <b>POLYMUN SCIENTIFIC IMMUNBIOLOGISCHE FORSCHUNG GMBH [AT/AT]; Nussdorfer Lände 11, A-1190 Wien (AT).</b></p> <p>(72) Erfinder; und</p> <p>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): <b>KATINGER, Hermann [AT/AT]; Heiligenstädter Strasse 127A/7/8, A-1190 Wien (AT). VORAUER-UHL, Karola [AT/AT]; Operngasse 36/37, A-1040 Wien (AT). FÜRNSCHLIEF, Eckhard [AT/AT]; Grtngasse 25/11-14, A-1050 Wien (AT).</b></p> <p>(74) Anwalt: <b>PATENTBÜRO BÜCHEL &amp; PARTNER AG; Letzanaweg 25, FL-9495 Triesen (LI).</b></p>	<p>(81) Bestimmungsstaaten: <b>AL, AM, AT, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TT, UA, UG, US, UZ, VN, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO Patent (KE, LS, MW, SD, SZ, UG).</b></p> <p><b>Veröffentlicht</b>  Mit internationalem Recherchenbericht.  Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</p>	
<p>(54) Title: <b>APPLICATION OF SUPEROXIDE DISMUTASE IN LIPOSOMES</b></p> <p>(54) Bezeichnung: <b>APPLIKATION VON SOD IN LIPOSOMEN</b></p> <p>(57) Abstract</p> <p>Superoxide dismutase (SOD), preferably rhSOD, is used in liposomes, optionally mixed with hyaluronic acid and/or at least one physiologically acceptable carrier, and other optional additives, to prepare a pharmaceutical composition useful against increased concentrations of superoxide radicals and/or the damage caused thereby. These compositions can be administered topically, orally and/or parenterally to prevent and/or heal in particular burns, skin lesions due to radiation, inflammations, rheumatic and arthritic diseases, bronchitis, ARDS, emphysema, allergic oedemas and other inflammatory process, possibly trigged by microbial infections. They may also be used in the cosmetic treatment of furuncles, acne and the like. Also disclosed is a process for improving the preservability of organic, preferably biogenic, materials, in particular organ transplants and liquids with organic components, as well as foodstuffs, by using the disclosed compositions.</p> <p>(57) Zusammenfassung</p> <p>Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf die Verwendung von Superoxid-Dismutase (SOD), vorzugsweise rhSOD in Liposomen, gegebenenfalls in Mischung mit Hyaluronsäure und/oder mindestens einem physiologisch akzeptablen Träger, sowie gegebenenfalls weiteren Zusätzen, für die Herstellung einer pharmazeutischen Zubereitung zur Anwendung gegen erhöhte Konzentrationen an Superoxidradikalen und/oder dadurch verursachte Schädigungen. Die erfindungsgemässen Zubereitungen sind prophylaktisch und/oder therapeutisch durch äusserliche, orale und/oder parenterale Applikation einzusetzen, insbesondere bei Verbrennungen und Strahlenschädigungen der Haut, bei - gegebenenfalls durch mikrobielle Infektionen ausgelöst - Entzündungen, rheumatischen und arthritischen Erkrankungen, Bronchitis, Schocklunge, Emphysem, allergischen Schwellungen und sonstigen entzündlichen Prozessen, sowie zur kosmetischen Behandlung von Furunkeln, Akne und dgl. Die Erfindung bezieht sich weiters auf ein Verfahren zur Verbesserung der Haltbarkeit von organischen, vorzugsweise biogenen, Materialien, insbesondere von Organtransplantaten und Flüssigkeiten mit organischen Komponenten, sowie von Lebensmitteln, unter Verwendung der erfindungsgemässen Zubereitungen.</p>		

### LEDIGLICH ZUR INFORMATION

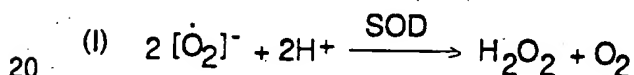
Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	GA	Gabon	MR	Mauretanien
AU	Australien	GB	Vereinigtes Königreich	MW	Malawi
BB	Barbados	GE	Georgien	NE	Niger
BE	Belgien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BJ	Benin	IE	Irland	PL	Polen
BR	Brasilien	IT	Italien	PT	Portugal
BY	Belarus	JP	Japan	RO	Rumänien
CA	Kanada	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SI	Slowenien
CI	Côte d'Ivoire	KZ	Kasachstan	SK	Slowakei
CM	Kamerun	LJ	Liechtenstein	SN	Senegal
CN	China	LK	Sri Lanka	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Letland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
ES	Spanien	MG	Madagaskar	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	ML	Mali	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MN	Mongolei	VN	Vietnam

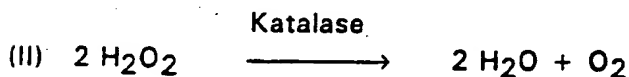
# Applikation von SOD in Liposomen

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf die Verwendung von Superoxid-Dismutase (SOD), vorzugsweise von rekombinanter humaner SOD in Liposomen, zur Herstellung pharmazeutischer Zubereitungen, gegebenenfalls in einer Mischung mit Hyaluronsäure und/oder mindestens einem physiologisch akzeptablen Träger und/oder gegebenenfalls weiteren Zusätzen, zur therapeutischen und/oder prophylaktischen Anwendung gegen erhöhte Konzentrationen an Superoxidradikalen und/oder dadurch verursachte Schädigungen.

Superoxidradikale sind ausserordentlich reaktive Zwischenformen des natürlichen Sauerstoffmoleküls und können durch diese Eigenschaft organische Verbindungen in den Zellen des menschlichen Körpers irreversibel schädigen. Als Schutz vor der gefährlichen Wirkung dieser Superoxid-Radikale verfügen die Zellen über ein Enzym, welches in der Lage ist, solche Superoxid-Radikale rasch in das schneller metabolisierbare und weniger giftige Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) umzuwandeln.



Im Anschluss daran wird normalerweise das noch immer giftige Wasserstoffperoxid durch das Enzym Katalase in die ungefährlichen Bestandteile Wasser und Sauerstoff zerlegt.



Das Enzym Superoxiddismutase (SOD) kommt sowohl im menschlichen und tierischen Körper als auch in Pflanzen und vermutlich allen Mikroorganismen vor, welche mit Luftsauerstoff direkt in Kontakt kommen (aerobe Bakterien und Pilze). In den Zellen höherer Organismen (Eukaryonten) gibt es hauptsächlich zwei Typen dieser SOD: eine Mangan enthaltende SOD, die in den Mitochondrien lokalisiert ist und der bakteriellen SOD sehr ähnlich ist, und eine zweite, welche im Zytosol frei vorliegt und Kupfer- und Zinkatome enthält.

Im nachfolgenden soll - soweit nicht anders erwähnt - unter dem Begriff SOD hauptsächlich Cu,Zn-SOD, ausgenommen jene aus Rinderblut-Erythrozyten, sowie bakterielle oder mitochondriale Mn-SOD und/oder Fe-SOD, sowie rekombinante humane Cu,Zn-SOD (rhSOD) verstanden werden.

5

Superoxid-Dismutase ist unter dem Namen Orgotein bereits seit 1939 bekannt, die Dismutase-Aktivität wurde hingegen erst 1969 von McCord und Fridovich entdeckt und beschrieben. Ihre praktische Verwendung war in der Vergangenheit insbesondere durch die Kurzlebigkeit bzw. kurze biologische Verfügbarkeit des Proteins unter natürlichen Umständen begrenzt, was sich natürlich auf die Häufigkeit der Dosierintervalle, die zu wählenden Therapie-Dosen und die damit verbundenen Kosten nachteilig auswirkt.

10

Die meistuntersuchte und verwendete SOD war bislang die Cu,Zn-SOD aus Rinderblut-Erythrozyten. Nachdem in der klinisch-therapeutischen Anwendung von Rinderblut-SOD, vor allem gegen arthritische Beschwerden, schwere und z.T. sogar tödliche Nebenwirkungen aufgetreten sind, wurden beispielsweise in Österreich Präparate mit Rinderblut-SOD verboten. Einen Ausweg aus dieser Situation bietet vor allem die Herstellung von rekombinanter humaner SOD, wie beispielsweise in AT 397.812 (Polymun Scientific, 1994) beschrieben.

15

20

Um die Kurzlebigkeit bzw. kurze biologische Verfügbarkeit des Wirkstoffes SOD besser in den Griff zu bekommen, bietet sich unter anderem die Inkorporation von SOD-Molekülen in Liposomen an (Senga et al. 1990. Transplant.Proc. 22:2025).

25

Bereits die ersten Einsatzversuche betrafen die Behandlung von Entzündungen und entzündlichen Vorgängen an der Haut. Jedoch wird in der Literatur zwischenzeitlich auch von Einsätzen bei Osteoarthritis und rheumatischer Arthritis berichtet (Hartmann et al. 1986. Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A. 83:7142; Bannister et al. 1987. Critical Rev.Biochem. 22:111). Auch wird - speziell im Bereich der Medizin - berichtet, dass SOD die Lagerfähigkeit von Organen zum Zwecke einer späteren Transplantation (Olson et al. 1988, Transplant.Proc. 20:961) verbessern soll, und auch ein Einsatz zur Nahrungsmittel-Konservierung wird bereits erwähnt (WO 85/01503).

30

35

Primäres Ziel der vorliegenden Erfindung ist es, pharmazeutische Zubereitungen zur Verfügung zu stellen um SOD, vorzugsweise rhSOD

eingeschlossen in schützenden Liposomen, schonend, effektiv und mit einer besseren Bioverfügbarkeit an die zu behandelnden Stellen des Körpers heranzubringen. Insbesondere ist es den Erfindern gelungen, trotz eines noch immer bestehenden allgemeinen Vorurteils der Fachwelt, liposomal verpackte SOD erfolgreich bei Verbrennungen und Verbrühungen sowie bei Strahlenschädigungen, hervorgerufen beispielsweise durch UV-Strahlen oder ionisierende Strahlen, einzusetzen, insbesondere durch äusserliche Anwendung. Im Falle der Strahlenexposition ist neben dem therapeutischen Einsatz auch eine prophylaktische Anwendung, beispielsweise zusammen mit einem strahlenfilternden oder strahlenabsorbierenden Schutzmittel, möglich.

Ein weiteres Ziel ist es, eine pharmazeutische Zubereitung auf Basis SOD in Liposomen zur Verfügung zu stellen, die die genannten Nachteile des Standes der Technik überwindet und damit zusätzliche Anwendungsgebiete, insbesondere im Bereich der Kosmetik, eröffnet.

Ebenso ist es ein Ziel der vorliegenden Erfindung, SOD, vorzugsweise rhSOD eingeschlossen in schützenden Liposomen, schonend, effektiv und mit einer besseren Haltbarkeit sowie länger anhaltender Wirkung an die zu behandelnden organischen Materialien, beispielsweise pflanzliche oder tierische Gewebe, Organe, Organ- oder Gewebetransplantate, kosmetische Präparate auf organischer Basis und/oder Lebensmittel heranzubringen.

Ein besonderes Ziel der vorliegenden Erfindung ist die Nutzung des synergistischen Effektes einer Mischung von Hyaluronsäure und SOD. Hyaluronsäure ist in der Fachwelt seit kurzem auch für ihre "Radikalfänger-Eigenschaften" bekannt, und ihr Einsatz in der Wundbehandlung ist wiederholt beschrieben worden (Amgen, WO 9214480, 1992). Auch die Verwendung von Hyaluronsäure zusammen mit Colony Stimulating Factor (CSF) oder Platelet Derived Growth Factor (PDGF) zur Beschleunigung der Wundheilung wurde in der Literatur beschrieben (Zymogenetics, US 5128321, 1992), ebenso wie Hyaluronsäure als Zusatz in Kosmetika und pharmazeutischen Präparaten (Shiseido, WO 9104279, 1991).

Bislang nicht beschrieben ist hingegen - erstaunlicherweise - eine Kombination von Hyaluronsäure und SOD, insbesondere eine Mischung von Hyaluronsäure und liposomal inkorporierter SOD. Inwieweit hier ein Vorurteil der Fachwelt besteht oder bestanden hat, kann zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht hinreichend beurteilt werden. Jedenfalls hat sich im Zuge der Experimente, die

schliesslich zur vorliegenden Erfindung geführt haben, überraschend herausgestellt, dass Hyaluronsäure in fast idealer Weise die Wirkung von SOD, auch von liposomal inkorporierter SOD, unterstützt und verstärkt.

- 5    Verbrennungen und Verbrühungen und/oder eine gesundheitsschädigende Dosis an ionisierender oder UV-Strahlung induzieren unter anderem eine kaskadenähnlich ablaufende Reaktion, die beispielsweise für das "Nachbrennen" (= Zunahme der nekrotischen Schädigung) in der 2. und vor allem 3. Dimension verantwortlich ist. Das Problem in der herkömmlichen
- 10    Sofortbehandlung von Brandwunden und Strahlenschäden besteht in der Praxis darin, dass es bisher ausser der Kaltwasser-Soforttherapie kein lokal anwendbares Mittel gibt, das man als Soforttherapeutikum zur Unterdrückung von Nachbrenn-Phänomenen einsetzen könnte. Von fetthaltigen oder fettfreien Brandsalben oder -gelen ist in dieser Richtung kein vorteilhafter, heilender
- 15    Effekt bekannt oder zur Zeit zu erwarten. Es ist daher mehr als erstaunlich, dass SOD in Liposomen bislang zur lokalen, äusserlichen Sofort-Wundbehandlung - ausser in Form von Injektionen direkt in die Wunde - weder in der Tiermedizin noch in der Humanmedizin eingesetzt wird, zumal SOD in Liposomen bereits seit mehr als 5 Jahren bekannt ist
- 20    (J03101626, 1989).

- Es wird in der Literatur allerdings auch beschrieben, dass die Verwendung von SOD zur Unterstützung der Wundheilung bzw. des Überlebens von Balb/c Mäusen mit Verbrennungen und künstlich erzeugter Infektion, keinen
- 25    signifikanten Heilerfolg erzielen konnte (Fang et al., The Journal of Trauma, Vol.30. No.4 :453-456, 1990).

- Trotz dieser Nachteile des Standes der Technik und dem möglichen Vorurteil der Fachwelt gegenüber liposomal dargebotenen Wirkstoffen zur topischen, insbesondere äusserlichen, Anwendung am Körper bzw. an der
- 30    Körperoberfläche, ist es den Erfindern dank ihren erfinderischen Annahmen in unerwarteter Weise gelungen, SOD in Liposomen erfolgreich gegen thermische und strahleninduzierte Haut- und Gewebeschädigungen einzusetzen.

- 35    Folgende Überlegungen spielten dabei eine Rolle: durch das Trauma s lbst, auch im Falle des intensiven Sonnenbrandes, fällt die Barriere der Hornschicht mehrheitlich oder sogar völlig weg, d.h. vor der Entwicklung einer Ödemformation bestünde die Chance zur optimalen Wirkstoffentfaltung in

Richtung Lederhaut und subcutan unter das Corium, insbesondere im Falle einer frühzeitigen Applikation von SOD, vorzugsweise rhSOD, in Liposomen.

Der überraschende Erfolg bei der äusserlichen topischen Behandlung der  
5 erwähnten Gewebeschädigungen ist vermutlich weiters darauf zurückzuführen, dass durch die Gewebeverletzung verstärkt Makrophagen gebildet werden, welche im Zuge ihrer immunologischen Schutzfunktion (Infektionsabwehr, Beseitigung von Zellbruchstücken) mit den Liposomen in Kontakt treten, deren Lipidschicht auflösen und dabei den Inhalt - die SOD-  
10 Moleküle - freisetzen, worauf diese wiederum ihre Superoxid abbauende und damit auch gewebeschützende Aktivität entfalten können.

Im Zuge der Experimente, die schliesslich zur vorliegenden Erfindung geführt haben, konnte ausserdem überraschend herausgefunden werden, dass dank  
15 des Einschlusses der SOD-Moleküle in Liposomen nicht nur deren Haltbarkeit und Bioverfügbarkeit verlängert, sondern auch die zur Erreichung des gewünschten Effektes nötige Konzentration an SOD - gegenüber SOD-Zubereitungen ohne Liposomen - um bis zu einem Faktor 10 reduziert werden konnte, ohne dabei Wirkungsverluste in Kauf nehmen zu müssen. Darüber  
20 hinaus wird durch die liposomale Darreichungsform auch eine physiologisch günstigere Dosierung des Wirkstoffes am Ort des Bedarfes erreicht, was sich natürlich auf die Menge und/oder Häufigkeit der Dosierungen und die damit verbundenen Kosten sehr vorteilhaft auswirkt. Dieser vorteilhafte Effekt der physiologisch günstigeren Dosierung liposomal inkorporierter SOD vor Ort  
25 kommt auch bei Entzündungen und entzündlichen Prozessen an der Körperoberfläche und im Inneren des Körpers, sowie bei Verfahren zur Verbesserung der Haltbarkeit organischer Materialien zum Tragen.

Es gibt allerdings auch Vermutungen, dass möglicherweise nicht nur die  
30 direkte enzymatische Wirkung des SOD-Proteins für den Heilerfolg ausschlaggebend ist. Es ist von anderen Enzymen, z.B. Cytochrom A, Histon, Lysozym, Ribonuclease, bekannt, dass sie beispielsweise in dimerisierter Form zusätzliche Eigenschaften aufweisen, die jene des Monomers beträchtlich erweitern, wobei auf diese Weise das Wirkungsspektrum und der jeweilig  
35 Einsatzbereich der dimeren Proteine gegenüber den Monomeren in vorteilhafter Weise ausgedehnt wird (Bartholeyns and Zenebergh, Europ.J.Cancer, Vol.15, 1979, 85-91).

Im Zuge des Einschliessens der SOD in die Liposomen gemäss der vorliegenden Erfindung, wie etwa in Beispiel 1 beschrieben, lagert sich zumindest ein Teil der SOD-Moleküle mit einem Molekulargewicht von ca. 32000 Dalton zu Aggregaten von 2 oder 3 Molekülen zusammen. Es ist denkbar, wenngleich auch noch nicht nachgewiesen, dass durch diese Aggregate ein zusätzlicher vorteilhafter Effekt, beispielsweise in Hinblick auf eine verstärkte Stimulation von Phagocytose-Aktivitäten, zum Tragen kommt.

Bei Verwendung von Hyaluronsäure in einer Mischung mit SOD, insbesondere rhSOD, mit oder ohne Liposomen, hat sich überraschenderweise herausgestellt, dass sich ein synergistischer Effekt insoferne ergibt, als sich, insbesondere bei äusserlicher Anwendung, ein - im Vergleich zu einer SOD-behandelten Brandwunde ohne Hyaluronsäure - wesentlich glatteres und elastischeres Gewebe neu bildet. Dieser Effekt konnte auch im Falle von entzündeten Wunden an der Körperoberfläche festgestellt werden. Hyaluronsäure dient dabei im Gemisch mit liposomaler SOD sowohl als synergistisch wirkender Radikalfänger als auch als pharmazeutisch akzeptabler Trägerstoff.

Im Rahmen der Experimente, welche der vorliegenden Erfindung zugrunde liegen, hat sich ausserdem unerwarteterweise herausgestellt, dass sich bei Verwendung einer Zubereitung von Hyaluronsäure in einer Mischung mit SOD, insbesondere rhSOD in Liposomen, ein synergistischer Effekt insoferne ergibt, als eine im Vergleich zur SOD-Behandlung ohne Hyaluronsäure signifikant längere Haltbarkeit bzw. Wirkungsdauer der Zubereitung selbst und damit auch eine längere Haltbarkeit der behandelten Materialien resultiert; dieser Effekt zeigt sich insbesondere dann, wenn die SOD frei in der Zubereitung, d.h. nicht in Liposomen eingeschlossen, vorliegt. Sowohl SOD allein als auch Hyaluronsäure allein waren in dieser Hinsicht einer Mischung beider Komponenten deutlich unterlegen.

Dieser synergistische Effekt einer Mischung von SOD und Hyaluronsäure wird möglicherweise dadurch begünstigt, dass die Hyaluronsäure sowohl die Phospholipidschichten der Liposomen und/oder die empfindlichen SOD-Moleküle vor schädigenden, d.h. vornehmlich oxidierenden, Einflüssen von aussen schützt, als auch nach Inaktivierung der SOD noch einen eigenen, wenn auch nur geringen, Beitrag zur Superoxidradikal-Beseitigung leistet.



Die vorliegende Erfindung enthält mehrere verschiedene Ausführungsformen der Anwendung von SOD, insb. sonders rhSOD in Liposomen, mit oder ohne Hyaluronsäure und gegebenenfalls in Kombination mit Trägerstoffen und/oder weiteren Zusätzen, für die Herstellung von pharmazeutischen Zubereitungen  
5 gegen eine Reihe von Indikationen.

Eine Ausführungsform bzw. ein Merkmal der Erfindung bezieht sich auf die Verwendung von SOD, insbesondere von rekombinanter humaner SOD (rhSOD) in Liposomen, gegebenenfalls in einer Mischung mit Hyaluronsäure  
10 und/oder einem physiologisch akzeptablen Träger sowie gegebenenfalls weiteren, für galenische Formulierungen üblichen Zusätzen, zur Herstellung von pharmazeutischen Zubereitungen gegen Verbrennungen, Verbrühungen und Strahlenschädigungen, insbesondere solchen, die durch UV-Strahlen verursacht werden.

15 In einer erfindungsgemässen Ausführungsform wird z.B. in Liposomen inkorporierte rhSOD als keimfreies Wundgel formuliert, wobei der gegebenenfalls beigemischte Träger fettarm oder fettfrei ist und aus der Gruppe der organischen und anorganischen Hydrogele stammt, und direkt auf  
20 die Brandwunde aufgetragen. Neben einer klinischen Anwendung für Patienten mit zweit- und drittgradigen Verbrennungen, z.B. aus Unfallsituationen, kommt eine solche Formulierung insbesondere auch Personen zugute, welche sich beim Sonnenbaden am Wasser oder im Schnee grossflächige oder lokal begrenzte Sonnenbrände zugezogen haben.

25 Gerade bei Brandwunden hat es sich auch als besonders vorteilhaft erwiesen, wenn man die SOD-haltigen Liposomen, in flüssiger Form durch Aufsprühen aus einer Spraydose oder Sprühflasche auf die verletzte Stelle aufbringt. Man vermeidet dadurch den direkten Kontakt der Wunde mit den Fingern oder  
30 einem sonstigen Hilfsmittel zur Auftragung, beispielsweise eines Gels, und reduziert damit die Gefahr einer zusätzlichen Infektion.

In einer anderen Ausführungsform wird liposomal inkorporierte SOD, gegebenenfalls mit Hyaluronsäure und/oder weiteren Zusätzen, auf -  
35 vorzugsweise - sterile Wundpflaster und/oder Wundabdeckungen aufgebracht, um auf diese Weise in rasch verfügbares und leicht handhabbares Mittel zur effektiven Behandlung und/oder Selbst-Behandlung, von kleineren und mittelgrossen Brandwunden bzw. Hautverbrennungen bereits am Ort des

Geschehens an der Hand zu haben. Der besondere Vorzug dieser Anwendungsform besteht in der einfachen Art und Weise der Anwendung, wie sie auch von medizinisch ungeschulten Personen sicher vorgenommen werden kann, beispielsweise von Eltern, deren Kind sich am Herd die Finger verbrannt oder mit heissem Wasser verbrüht hat.

Ein besonderer Aspekt der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung von SOD, insbesondere rhSOD in Liposomen, zur Herstellung von Zubereitungen, die vor, während oder nach einer Strahlenexposition eingesetzt werden. Für rein therapeutische Anwendungen, d.h. nach bereits erfolgter übermässiger Strahlenbelastung, beispielsweise bei einem Sonnenbrand, empfiehlt sich zur Milderung der Folgen der Strahleneinwirkung der Einsatz der erfindungsgemässen SOD-Zubereitungen, vorzugsweise rhSOD in Liposomen, gegebenenfalls in einer Mischung mit mindestens einem physiologisch akzeptablen Träger und/oder Hyaluronsäure, sowie gegebenenfalls weiteren Zusätzen, in Form von Emulsionen, Suspensionen, Lösungen, Lotions oder allenfalls niedrigviskosen Salben oder Gelen.

Besonders vorteilhaft sind die Zubereitungen, welche mittels einer Sprühvorrichtung, beispielsweise einem Spray, auf die geschädigten Hautpartien aufgebracht werden können. Einerseits wird dadurch der direkte Kontakt und damit eine mögliche Infektion der verletzten Haut mit möglicherweise unreinen Fingern oder sonstigen Hilfsmitteln zur Auftragung der Zubereitung vermieden und andererseits erspart man sich dadurch eine mehr oder weniger schmerzhaft Auftragung durch Verreiben beispielsweise eines höherviskosen Gels.

Zur prophylaktischen und gleichzeitig therapeutischen Anwendung vor und während einer Strahlenexposition eignen sich vor allem jene erfindungsgemässen Zubereitungen, welche neben SOD und gegebenenfalls Hyaluronsäure auch noch mindestens ein strahlenfilterndes oder strahlenabsorbierendes Schutzmittel, vorzugsweise einen Lichtfilter oder UV-Absorber, insbesondere einen UVB-Filter, enthalten. Zusätzlich können auch noch weitere Substanzen, vor allem Hautpflegefaktoren, vorhanden sein.

Durch die Anwesenheit von SOD und gegebenenfalls Hyaluronsäure neben üblichen Lichtfilter-Substanzen können die unangenehmen Folgen eines Sonnenbrandes erheblich vermindert werden. Derartige prophylaktisch und

therapeutisch wirkende Sonnenschutzpräparate können vorteilhaft bei jeder Art des Sonnenbadens, ob am Strand, im Gebirge, auf See, auf der Schipiste oder in einem Solarium, eingesetzt werden. Insbesondere Menschen mit empfindlicher Haut und jene Hauttypen, bei denen eine Hautbräunung durch UV-Strahlen nicht erfolgt, profitieren am meisten von dieser Anwendungsform der vorliegenden Erfindung.

Eine andere Ausführungsform bezieht sich auf die Herstellung von Zubereitungen zur therapeutischen und/oder prophylaktischen Anwendung bei akuten und chronischen Entzündungen und entzündlichen Prozessen, bei rheumatischen Erkrankungen, insbesondere bei rheumatischen Gelenkentzündungen und/oder Osteoarthritis, aber auch bei Entzündungen der Atemwege, insbesondere bei Bronchitis, Schocklunge (Acute Respiratory Distress Syndrome, ARDS), Emphysemen, und anderen Entzündungsvorgängen, erfolgreich anwendbar. Speziell für den Bereich kosmetischer Anwendungen zur prophylaktischen und/oder therapeutischen Behandlung von lokalen Entzündungen der Haut wie beispielsweise Furunkeln oder Akne, die bekanntermassen für viele Menschen eine erhebliche kosmetische Beeinträchtigung darstellen, eröffnen sich dadurch vielversprechende Möglichkeiten.

In einer erfindungsgemässen Ausführungsform wird z.B. in Liposomen inkorporierte rhSOD als steriles Wundgel formuliert, wobei der gegebenenfalls beigemischte Träger fettarm oder fettfrei ist und aus der Gruppe der organischen und anorganischen Hydrogele stammt, und direkt auf die entzündete Stelle aufgetragen. Ein fettarmer oder fettfreier Träger ist vor allem bei offenen, entzündeten Wunden von Vorteil, da überhöhte Lipidkonzentrationen im Wundbereich zur Entstehung von toxischen Abbauprodukten führen können. Hyaluronsäure ist in solchen Zubereitungen besonders vorteilhaft einsetzbar, entweder als alleiniger Träger oder in einer Mischung mit mindestens einem weiteren Träger der obigen Kategorie. Ausserdem können weitere geeignete Zusätze, wie sie beispielsweise für galenische Formulierungen üblich sind, ebenfalls in den erfindungsgemässen Zubereitungen enthalten sein.

Gerade bei oberflächlichen Entzündungen hat es sich auch als besonders vorteilhaft erwiesen, wenn man die SOD-haltigen Liposomen in flüssiger Form durch Aufsprühen aus einer Spraydose, Sprühflasche oder sonstigen

Sprühvorrichtung auf die entzündete Stelle aufbringt. Man vermeidet dadurch den direkten Kontakt der Wunde mit den Fingern oder einem sonstigen Hilfsmittel zur Auftragung der Zubereitung und reduziert damit die Gefahr einer zusätzlichen Infektion. In bestimmten Fällen kann es aber auch von Vorteil  
5 sein, wenn mindestens eine der erfindungsgemässen Zubereitungen auf - gegebenenfalls sterile - Wundabdeckungen, beispielsweise Wundauflagen, Heftpflaster und dergleichen, aufgebracht wird. Solcherart präparierte Wundabdeckungen eignen sich gut für die einfache und rasche Behandlung, gegebenenfalls auch Selbstbehandlung, beispielsweise bei entzündeten  
10 Wunden und/oder rheumatischen Gelenksentzündungen.

In einer weiteren Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird liposomal inkorporierte SOD, insbesondere rhSOD, zusammen mit Hyaluronsäure und gegebenenfalls mindestens einem zusätzlichen fettarmen oder fettfreien,  
15 Trägerstoff, insbesondere aus der Gruppe der organischen und anorganischen Hydrogele, und gegebenenfalls weiteren Zusätzen, als Injektionslösung formuliert und bei rheumatologischen und/oder orthopädischen Indikationen, beispielsweise rheumatischen Gelenksentzündungen oder Osteoarthritis, erfolgreich angewendet.  
20 Dabei kann die Injektion sowohl direkt in die betroffenen Gelenke (intraartikulär) oder Körperregionen oder auf sonstige parenterale, vorzugsweise intravenöse, Weise erfolgen.

In gewissem Umfang lassen sich Linderungen rheumatisch-arthritischer Leiden  
25 auch durch äusserliche Behandlung, beispielsweise durch eine ebenfalls erfindungsgemässe, äusserliche Applikation von SOD in Liposomen, insbesondere im Gemisch mit Hyaluronsäure, erzielen. Dabei können die Wirkstoffe sowohl in Form von Salben oder Gelen, allenfalls in Mischung mit zusätzlichen, vorzugsweise fettarmen oder fettfreien, Trägerstoffen,  
30 insbesondere aus der Gruppe der organischen und anorganischen Hydrogele, als auch in Form von Sprays oder Tinkturen formuliert und angewendet werden. Geeignete Zusätze, wie sie für galenische Formulierungen von Pharmazeutika üblich sind, können ebenfalls in den Zubereitungen enthalten sein. In manchen Fällen kann auch eine begleitende, orale Verabreichung von  
35 liposomaler SOD in Form von Tabletten, Kapseln, Dragees, Pulvern etc. unterstützend wirken.

In einer weiteren Ausführungsform konnten bestimmte degenerative Erscheinungen wie Emphyseme, insbesondere Hautemphyseme, durch die erfindungsgemässe Anwendung von SOD in Liposomen, gegebenenfalls in einer Mischung mit Hyaluronsäure und/oder mindestens einem physiologisch akzeptablen Träger, erfolgreich abgeschwächt und eingedämmt werden. Möglicherweise spielen auch hier neben der rein enzymatischen Wirkung der SOD noch zusätzliche, phagocytosestimulierende Effekte der SOD-Aggregate in den Liposomen eine synergistische Rolle.

- 10 Ähnliches dürfte auch für die erfolgreiche therapeutische Anwendung der pharmazeutischen Zubereitungen der vorliegenden Erfindung bei Entzündungen der Atemwege und der Lunge, wie z.B. Bronchitis, Schöcklunge (ARDS) und Lungenemphysem, zum Tragen kommen. In diesem Falle hat sich speziell die Applikation einer Lösung oder Emulsion von liposomal inkorporierter SOD per
- 15 Inhalation als besonders gut geeignet erwiesen.

Die Anwendung der liposomalen SOD-Zubereitungen ist insbesondere im Bereich der kosmetischen Störungen sehr erfolgreich. Kleine lokale Entzündungen, Furunkel, Akne und ähnliche Erscheinungen sind durch die erfindungsgemässe Anwendung der SOD-haltigen Zubereitungen, insbesondere in Form von Salben, Gelen, Crèmes oder in flüssiger Form durch Aufsprühen, wirksam behandelbar. Bei wiederholter, vorzugsweise regelmässiger, Applikation ist auch ein gewisser prophylaktischer Effekt in Bezug auf die Entstehung neuer Hautentzündungen, beispielsweise von Furunkeln, erzielbar.

20 Vielleicht hängt auch dies mit einer durch die SOD-Aggregate möglicherweise ausgelösten oder stimulierten Aktivierung von Phagocytose-Vorgängen zusammen.

Bei Verwendung einer Mischung von liposomaler SOD und Hyaluronsäure erfolgt ausserdem die Abheilung der Entzündung(en) unter Neubildung eines elastischeren und vor allem glatteren Gewebes im Vergleich zu Hyaluronsäure-freien Zubereitungen. Speziell für kosmetische Anwendungen an sichtbaren Körperstellen, also beispielsweise im Gesicht, ist dies ein erheblicher Vorteil.

- 35 Die erfindungsgemässen Zubereitungen der vorliegenden Erfindung sind im allgemeinen dann am wirksamsten, wenn die SOD, je nach Anwendungsfall und Art der Applikation, in einer Konzentration von  $\geq 0.01$  Gew.%, insbesondere von 0.01 bis 5 Gew.% und die gegebenenfalls zusätzlich

- vorhandene Hyaluronsäure in einem Anteil von  $\geq 0.05$  Gew.%, insbesondere 0.1 bis 5 Gew.% der fertigen, anwendungsbereiten Zubereitung vorliegt. Für topische Anwendungen hat sich eine Menge von 0.01 bis 1 mg SOD/cm<sup>2</sup> Läsionsfläche bzw. Körperoberfläche als am besten geeignet erwiesen. Orale oder parenterale Applikationen werden hingegen vorteilhaft mit SOD-Dosen von 0.5 bis 50 mg/kg Körpergewicht durchgeführt, wobei für wiederholte SOD-Gaben im Rahmen einer Therapie die Dosis vorteilhafterweise bei 0.5 bis 10 mg/kg\*Tag eingestellt wird.
- 10 Die vorliegende Erfindung bezieht sich weiters auf die Anwendung von SOD zur Herstellung von Zubereitungen, die zur Verbesserung der Haltbarkeit von verschiedenen organischen, vorzugsweise biogenen, Materialien eingesetzt werden können, sowie auf Verfahren zur Verbesserung der Haltbarkeit solcher organischer Materialien unter Verwendung der erfindungsgemässen
- 15 Zubereitungen.
- Grundsätzlich kann man gemäss der vorliegenden Erfindung SOD, vorzugsweise rhSOD in Liposomen, in Form einer wässrigen Lösung bzw. Emulsion mit und ohne Hyaluronsäure zubereiten und direkt zur
- 20 konservierenden Anwendung einsetzen. In verschiedenen Fällen kann jedoch die Beimischung einer oder mehrerer geeigneter Trägersubstanzen und/oder weiterer, für galenische Zubereitungen üblicher, Zusätze von Vorteil sein, um beispielsweise eine bestimmte, gewünschte Applikationsform zu ermöglichen oder zu vereinfachen.
- 25 Wesentlich für den erfindungsgemässen Einsatz der Zubereitungen, beispielsweise im Rahmen eines Verfahrens zur Verbesserung der Haltbarkeit der organischer Materialien gemäss der vorliegenden Erfindung, ist jedoch, dass das organische Material zumindest teilweise mit wenigstens einer der hierin beschriebenen Zubereitungen in Kontakt gebracht wird.
- 30 In einer Ausführung der vorliegenden Erfindung wird liposomal inkorporierte SOD, insbesondere rhSOD, in einer geeigneten Pufferlösung vorgelegt, um damit Organe oder organische Gewebe, die zum Zwecke einer Transplantation einem Spender entnommen wurden, in dem Zeitraum zwischen Entnahme und
- 35 Wiedereinpflanzung konservierend zu behandeln. Dabei hat sich eine Zubereitung mit einem SOD-Gehalt von 0,1-1 Gew.% als sinnvoll erwiesen. Die Organ- bzw. Gewebe-konservierende Behandlung erfolgt dabei am besten zuerst durch eine Spülung des betreffenden Organs nach üblichen Methoden

- der Organkonservierung, insbesondere durch Injektionen oder Infusion der flüssigen Zubereitung in das Organ, beispielsweise ein Herz, eine Niere, eine Leber etc., und vorzugsweise anschliessend durch Eintauchen oder noch besser Einlegen des jeweiligen Organs oder Gewebeteiles in ein Bad, welches ebenfalls liposomale SOD entweder in dem gleichen oder einem anderen geeigneten Puffer enthält. Auf diese Weise gelingt es, einerseits den Zeitraum der Zwischenlagerung beträchtlich zu verlängern und andererseits mögliche Organ- bzw. Gewebeschädigungen nach der Reimplantation zu vermindern.
- 10 Erfreulicherweise hat sich gezeigt, dass in diesem Fall durch Beimischung von Hyaluronsäure, beispielsweise in Konzentrationen von ca. 0.05 - 2.5 Gew.%, zur bestehenden Emulsion aus liposomaler SOD und Puffer ein zusätzlich synergistischer Effekt der oben beschriebenen Art erzielt werden konnte.
- 15 In einer anderen Ausführungsform wird liposomale SOD in einer flüssigen Zubereitung - mit und ohne Hyaluronsäure - auf Lebensmitteln ausgebracht, beispielsweise mittels Sprühflaschen, Spraydosen oder sonstigen Sprühvorrichtungen. Insbesondere leichtverderbliche Fleischwaren, aber auch Molkereiprodukte aller Art sowie Obst und Gemüse konnten durch diese einfache und leicht zu handhabende Massnahme in ihrer Haltbarkeit entscheidend verbessert werden. Die liposomal verpackte SOD fungiert in diesem Falle quasi als Antioxidans.
- 25 Auch Tauchbäder, welche wenigstens eine der erfindungsgemässen Zubereitungen enthalten und in welche die organischen Materialien, beispielsweise verschiedene Lebensmittel, über einen gewünschten Zeitraum eingetaucht oder eingelegt werden, sind geeignet, um die Wirkstoffe SOD und gegebenenfalls Hyaluronsäure mit dem organischen Material in Kontakt zu bringen.
- 30 Eine weitere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung bezieht sich auf den Einsatz von freier SOD, insbesondere rhSOD, oder liposomaler SOD, in einer Mischung mit Hyaluronsäure und gegebenenfalls mindestens einem weiteren geeigneten Träger zur Verbesserung der Haltbarkeit von kosmetischen Präparaten auf organischer Basis, insbesondere von Hautpflegemitteln.
- 35 Versuche haben gezeigt, dass sowohl SOD in Liposomen allein als auch freie oder liposomal inkorporierte SOD in einer Mischung mit Hyaluronsäure, hervorragend geeignet ist, als Zusatz zu dem organischen Material in

kosmetischen Präparaten wie Salben, Crèmes, Gelen, Ölen, Lotions, Wässern, Milks und dgl. deren Haltbarkeit zu verbessern. Insbesondere im Falle der Mischung mit Hyaluronsäure ergibt sich noch ein zusätzlich positiver Effekt in Hinblick auf eine gewisse Erhöhung der Geschmeidigkeit und Glättung der Haut nach Anwendung solcherart verbesserter Kosmetika.

Die Konzentration an SOD liegt in diesem Anwendungsfall bevorzugt zwischen 0.1 und 5 Gew.%, der Anteil an gegebenenfalls vorhandener Hyaluronsäure wird hingegen am besten mit 0.5-5 Gew.%, bezogen auf die endfertige Zubereitung, gewählt. Falls ausserdem ein oder mehrere Trägersubstanzen dazugemischt werden sollen, dann sollen diese vorzugsweise fettarm oder fettfrei sein und gegebenenfalls aus der Gruppe der organischen und anorganischen Hydrogele stammen.

Zum Zwecke der Verbesserung der Haltbarkeit von organischen Materialien wie beispielsweise pflanzlichen und tierischen Geweben, Organtransplantaten, Lebensmitteln, insbesondere leichtverderblichen Fleisch- und Wurstwaren, oder Kosmetika auf organischer Basis, haben sich SOD-Konzentrationen von 0.1 bis 100 mg/kg organisches Material als sinnvoll erwiesen.

Um die erfindungsgemässen Einsatzmöglichkeiten und die Wirkungsweise der hierin beschriebenen Zubereitungen noch weiter zu erläutern, werden im folgenden einige Beispiele angeführt. Die Beispiele dienen dem besseren Verständnis und sollen in keiner Weise den Inhalt oder Umfang der vorliegenden Erfindung einschränken.

#### Beispiel 1: Anwendung bei Verbrühungen

70 Albinokaninchen wurden in 7 Gruppen (A - G) eingeteilt. Jedem Kaninchen wurde eine Fläche von 5 x 10 cm auf dem Rücken abrasiert. Nach tiefer Narkotisierung wurden die Kaninchen an der abrazierten Rückenfläche einzeln in eine Wanne mit einer Öffnung von genau 3 x 5 cm, gefüllt mit heissem Wasser von 93,5 - 95°C, für exakt 16 Sekunden lang eingetaucht. Dadurch entstanden Verbrühungen zweiten bis dritten Grades. Die Verbrühungsflächen wurden gemäss untenstehender Tabelle 1 behandelt und mit sterilem Wundverband mit Aluminiumeinlage sorgfältig bedeckt. Der Verband wurde täglich gewechselt.



- 15 -

Die Liposomen mit inkorporierter rhSOD wurden folgendermassen hergestellt:  
Als Präparationsmethode für die grossteils multilaminaren Liposomen wurde  
die Einspritzmethode nach Batzri und Korn (Batzri, S. Korn, E.D. 1973,  
Biochim. Biophys. Acta 298:1015-19) verwendet. Die Lipidbestandteile L-a-  
5 Phosphatidylcholine, Dipalmitoyl (DPPC) Cholesterol und Stearylamin werden  
in einem molaren Verhältnis von 7:1:2 in 96% Ethanol gelöst. Die  
Lipidkonzentration der Liposomenlösung beträgt 10 µmol/ml. Das  
Ethanolvolumen wird so gewählt, dass die Ethanolkonzentration in der  
Präparation unter 7% liegt. Die lyophilisierte rhSOD wird in PBS gelöst. Die  
10 Proteinkonzentration der wässrigen Phase beträgt 10 mg/ml. Beide Lösungen  
werden auf 37°C temperiert. Die Liposomen werden durch kontinuierliche  
Injektion der ethanolischen Phase in die wässrige Phase produziert. Zum  
Abtrennen der nicht inkorporierten rhSOD bzw. des Ethanols wird die  
Liposomenlösung gegen PBS diafiltriert (Ultra/Diafiltrationseinheit Fa. Amicon;  
15 Membran: YM 100).  
Für die Endformulierung wird das Carbogel (Carbopol®, stark saure  
Acrylsäure-Polymerisate mit hohem Molekulargewicht, DAB9) in aqua dest.  
rehydriert und der pH-Wert auf 7.5 eingestellt. Die Liposomenlösung und das  
rehydrierte Gel werden homogen vermischt und bei 4°C gelagert. Der gesamte  
20 Herstellungsprozess wird mit sterilen Lösungen und im Laminarflow (sterile  
Reinraumbank) durchgeführt.

Herstellung des liposomal inkorporierten rhSOD-Hyaluronsäure-Gels:  
Lyophilisierte Hyaluronsäure wird in der wässrigen Liposomenlösung rehydriert  
25 und das fertige Gel bei 4°C gelagert.

Die oben erwähnten Versuchstiere wurden laufend von einem Tierarzt  
untersucht, es wurden keine Anzeichen einer klinischen Erkrankung der Tiere  
während des Versuchsablaufes festgestellt. Die Tiere zeigten auch keine  
30 posttraumatischen Schmerzerscheinungen nach dem Erwachen aus der  
Narkose, trotzdem wurde vorsichtshalber eine posttraumatische Analgesie  
eingeleitet.

Die Gruppe F blieb als Kontrollgruppe unbehandelt. Die übrigen Gruppen  
35 wurden nach folgendem Schema behandelt:

Tabelle 1

Test- gruppe	Anzahl der Tiere	Identifizierungs- nummern	Dosis und Verabreichung
A	10	1 - 10	0.1 mg rhSOD / cm <sup>2</sup> der Läsion, in Liposomen; 2x am ersten Tag appliziert
B	10	11 - 20	1 mg rhSOD / cm <sup>2</sup> der Läsion, in Gel ohne Liposomen; 1x am ersten Tag appliziert
C	10	21 - 30	1 mg rhSOD / cm <sup>2</sup> der Läsion; intraläsional injiziert
D	10	31 - 40	Kontrollgruppe: Gel mit leeren Liposomen; 1x am ersten Tag appliziert
E	10	41 - 50	Kontrollgruppe: Gel ohne Liposomen; 1x appliziert am ersten Tag
F	10	51 - 60	Kontrollgruppe: ohne Behandlung
G	10	61 - 70	0.1 mg rhSOD in Liposomen/ cm <sup>2</sup> der Läsion, mit Hyaluronsäure; 2x am ersten Tag appliziert

- Statistisch ausgewertet wurden die Grösse der Wunden (Planimetrie,  
5 fotografische Dokumentation), der Lokalstatus (Farbe, Vorliegen von Nekrosen, Epithelisierungszeichen, Kontrakturen, Behaarung, Kutimetrie, Granulationsgewebe), histopathologische Hautuntersuchungen und makroskopisch der allgemeine Heilungsverlauf (Photodokumentation).
- 10 Für die untersuchten Parameter konnte ein positiver Einfluss der in Liposomen inkorporierten rhSOD auf die Heilungs- und Regenerationsprozesse bei den behandelten Versuchstieren festgestellt werden. Am deutlichsten war die Wirkung der rhSOD 24 Stunden nach der Läsionssetzung. So gab es

beispielsweise zwischen den Testgruppen einen signifikanten Unterschied in der Läsionsgrösse, wobei bei den rhSOD-behandelten Tieren die Übergangszone der Nekrose in die umliegende nicht verbrühte Haut deutlich weniger von der Verbrühung betroffen war. Auch histologische

- 5 Untersuchungen bestätigten die makroskopischen Erhebungen. Das günstigste histopathologische Bild konnte für die Testgruppen A und G gefunden werden. Histologisch zeigten die Testgruppen A und G als einzige von allen Gruppen nach 4 Wochen keine Restnekrosen mehr. Die zusammenfassenden Befunde der Gruppen A und G ergaben folgendes Bild:

10

- die Läsionsgrösse war im Vergleich zu den anderen Testgruppen nach 24 Stunden unverändert;
- die Breite des Ödems war hingegen deutlich reduziert, es erfolgte eine beschleunigte Rückbildung;
- 15 - es gab keine Restnekrosen im Corium;
- Testgruppe G zeigte ausserdem eine glattere und elastischere Gewebeneubildung im Vergleich zu allen übrigen Testgruppen.

In einem Beobachtungszeitraum von 24 Stunden konnte eindeutig der positive  
20 Einfluss der in Liposomen inkorporierten rhSOD gezeigt werden, obwohl die Dosis der rhSOD in den Testgruppen A und G zehnmal geringer war als bei den Testgruppen B und C. Die Nachbrennerscheinungen der Verbrühungswunden sowie insbesondere auch das Ödem, bildeten sich am schnellsten und deutlichsten in den mit liposomal inkorporierter rhSOD behandelten Gruppen  
25 zurück.

#### Beispiel 2: Anwendung bei Verbrennungen

Ein Versuch mit Setzen von Verbrennungswunden wurde analog zur Methode  
30 von M. Choi und H.P. Ehrlich (American Journal of Pathology 142, 1993, 519-529) durchgeführt. 40 Ratten (Wistar, männliche Ratten) zu 300-350 g Körpergewicht wurden unter Standardbedingungen gehalten. Die anästhesierten Ratten (Anästhetikum: Pentobarbital, i.p.) wurden mit einem Stempel, der in kochendem Wasser erhitzt wurde, Brandwunden in Form eines  
35 Streifenmusters gesetzt. Zu diesem Zweck wurde der Stempel 30 sec. auf die rasierte Haut der Tiere gedrückt. Um das gewünschte Muster auf der Haut zu erhalten war der Stempel nach Choi und Ehrlich (1993) kammartig ausgebildet.

Die Ratten wurden in 4 Gruppen zu je 10 Tieren eingeteilt (Tabelle 2).

**Tabelle 2**

Testgruppe	Anzahl der Tiere	Verabreichung
1	10	Kontrollgruppe: ohne Behandlung
2	10	Trägergel mit leeren Liposomen
3	10	Gel mit rhSOD in Liposomen
4	10	rhSOD in Liposomen mit Hyaluronsäure im Trägergel

- 5 Die Herstellung der Liposomen und der Gele erfolgte analog zu Beispiel 1. Die Ratten wurden innerhalb von 48 Stunden sechsmal in regelmässigen Abständen behandelt, wobei die erste Behandlung wenige Minuten nach der Läsionssetzung erfolgte. Liposomal verpackte rhSOD wurde in einer Menge von 0.05 mg/cm<sup>2</sup> der Läsion eingesetzt, der Anteil an Hyaluronsäure in der
- 10 verwendeten Zubereitung betrug 3 Gew. %.

- Als Beurteilungskriterium für die potentielle Wirkung wurden die Planimetrie und die Makromorphologie des Wundmusters, das durch das Design des Stempels hervorgerufen wird, herangezogen. Weiters wurde eine
- 15 Standardhistologie (Hämatoxylin-, Eosin- und Vitalsfärbung; nach H. Millesi, 1970, Chirurgia Plastica et Reconstructia Vol. 8, Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York) der Gewebeproben durchgeführt. Es wurden nach 0 h, 25 h, 72 h, 7 Tagen und 21 Tagen Proben genommen.

- 20 Bei den Gruppen 3 und 4 blieb das durch die Stempelform bedingte Streifenmuster erhalten, d.h. dass die verbrannten Streifen vital erhalten bleiben. Bei den Gruppen 1 und 2 hingegen zeichnete sich eine Konfluenz zu einer mehr oder weniger einheitlichen Wundfläche ab. Bei den Gruppen 3 und 4 zeichnete sich auch ein günstiges histopathologisches Bild ab. Bei den mit in
- 25 Liposomen inkorporierter rhSOD behandelten Gruppen blieb das Muster der nicht exponierten Streifen erhalten. Die vom Stempeldruck betroffenen Flächen wurden durch Granulations- und Narbengewebe ersetzt, das mehrheitlich nekrosefrei war. Bei den Gruppen 1 und 2 war eine einheitliche nicht mehr gemusterte Narbenfläche, mit teilweise tiefen Nekrosen, zu
- 30 beobachten.

**Beispiel 3: Anwendung bei Strahlenschäden**

- Haarlose Mäuse wurden einer UV-Strahlung gemäss der minimalen Erythemdosis (MED) ausgesetzt. Der Versuchsaufbau wurde wie bei B.C. Pence and M.F. Naylor (B.C. Pence, M.F. Naylor 1993, J.of Investigative Dermatology 95: 213-16) beschrieben, durchgeführt. Eine Einzeldosis von UVB- Strahlung (290-320 nm) einer Westinghouse FS-40 Sonnenlampe wurde so eingesetzt, dass die Mäuse einer totalen Energie von  $0.09 \text{ J/cm}^2$  ausgesetzt waren. Diese Dosis entspricht der dreifachen MED für kaukasische Probanden. Es wurden 40 Mäuse in 4 Gruppen zu je 10 Tieren eingesetzt (Tab 3).

**Tabelle 3**

Testgruppe	Anzahl der Tiere	Verabreichung
1	10	Kontrollgruppe: ohne Behandlung
2	10	Trärgel mit leeren Liposomen
3	10	Gel mit rhSOD in Liposomen
4	10	rhSOD in Liposomen mit Hyaluronsäure im Trärgel

- Die Liposomen und Gele wurden analog zu Beispiel 1 hergestellt. Das Gel wurde unmittelbar (2-3 min.) nach der Strahlenexposition und dann noch zweimal in regelmässigen Abständen von 4 Stunden aufgetragen. Das Gel in der verwendeten Zubereitung enthielt 0.5 Gew.% Hyaluronsäure, die verabreichte Dosis an rhSOD betrug  $0.5 \text{ mg/cm}^2$  bestrahlter Körperoberfläche. Als Beurteilungskriterium wurde ein visueller Farbvergleich aller Tiere in regelmässigen Zeitabständen durchgeführt. Weiters wurde das Auftreten von "sunburn-cells" getestet.

- Bei den Gruppen 3 und 4 trat nach 10 Stunden ein im Vergleich zu den Gruppen 1 und 2 signifikant geringeres Erythem auf. Nach 24 Stunden wurden Gewebeproben entnommen und auf die charakteristischen "sunburn-cells" hin untersucht. Bei den Gruppen 3 und 4 traten keine oder nur vereinzelte "sunburn-cells" auf. Die Rötungsintensität konnte mit dem Auftreten von sunburn-cells korrelativ in Beziehung gesetzt werden.

Beispiel 4: Vergleich verschiedener Applikationsformen

- 140 männliche OF1 (outbred) Mäuse (vom Institut für Versuchstierzucht und -haltung, Himberg, Österreich), alle zwischen 8 - 10 Wochen alt, wurden nach dem Zufallsprinzip in 14 Gruppen (A-N) eingeteilt. Die Mäuse wurden unter Ethernarkose mit 50 µl PBS-Lösung, welche  $1 \times 10^5$  PFU/Maus (= 2-2.5 x LD<sub>50</sub>) des Influenzavirus A/WSN/33 (nachfolgend als WSN bezeichnet) enthielt, intranasal inokuliert. Die Behandlung der WSN-infizierten Mäuse begann am Tag 4 nach der Infektion, d.h. am Beginn des Auftretens klinischer Symptome der Influenza-Erkrankung der Mäuse. Die Mäuse wurden 1x täglich bis zum Tag 11 nach der Infektion behandelt. Sie wurden topisch, subkutan, intravenös und intranasal mit Präparaten behandelt, welche rhSOD in folgenden liposomalen Vesikelarten beinhalteten:
- a) rhSOD in kleinen, unilamellaren Vesikeln (SUV), Grösse  $\leq$  ca. 100 nm,
  - b) rhSOD in Injektionsvesikeln (IV), Durchmesser  $\leq$  ca. 200 nm, und
  - c) rhSOD in multilamellaren Vesikeln (MLV), Durchmesser  $\leq$  ca. 500 nm.

Tabelle 4 zeigt die Versuchsanordnung und die erzielten Ergebnisse. Zur topischen Behandlung wurde ein liposomales rhSOD-Gel auf der ventralen Seite der Mäuse, speziell im Brustbereich, durch Einsmieren 1x pro Tag aufgetragen. Es wurde dadurch ein Hautbereich von ca. 10 cm<sup>2</sup> mit einer ungefähr 2 mm dicken Gel-Schicht bedeckt. Die Konzentrationsangaben in Tabelle 4 beziehen sich dabei auf die behandelte Fläche in cm<sup>2</sup>. Die intranasale Applikation von rhSOD fand unter Ethernarkose der Tiere statt. Es wurden dabei 0.05 ml einer Suspension mit rhSOD in IV (1 mg/ml) mittels einer Mikropipette in the Nasenlöcher der Mäuse eingebracht.

Zur intravenösen Verabreichung der rhSOD-Suspensionen (siehe Tabelle 4) wurde in die Schwanzvene injiziert, während zur subkutanen Applikation dieselben Suspensionen wie bei der i.v. Injektion in den Hals- und/oder Schulterbereich subkutan injiziert wurden.

Die Anzahl der Todesfälle der Mäuse erhöhte sich nach dem 15. Tag seit der Infektion nicht mehr weiter (getesteter Zeitraum: Tag 15 bis Tag 25 nach der Infektion), sodass Mäuse, welche am 15. Tag überlebt haben, als von der Influenza-Infektion geheilt angesehen wurden.

Die Pathogenese einer Influenzavirus-Infektion bei Mäusen zeigt eher eine Überreaktion der Immunabwehr des Wirtsorganismus als einen direkten Effekt bezüglich der Virusvermehrung. Die Entstehung freier Sauerstoffradikale im

Aktivität in den Lungen und im Serum der Mäuse beeinflusst (Oda et al.,  
Sci nce. 1989. 244(4907):974-6).

Grupp e	Applikationsform und Dosis	Überlebend e je 10 Mäuse
A	topische Applikation eines Gels von rhSOD inkorporiert in SUV; Dosis: 0,15 mg rhSOD/cm <sup>2</sup> Behandlungsfläche	4 von 10
B	topische Applikation eines Gels von rhSOD inkorporiert in IV; Dosis: 0,15 mg rhSOD/cm <sup>2</sup> Behandlungsfläche	4 von 10
C	topische Applikation eines Gels von rhSOD inkorporiert in MLV; Dosis: 0,42 mg rhSOD/cm <sup>2</sup> Behandlungsfläche	3 von 10
D	topische Applikation eines Gels mit IV ohne rhSOD	2 von 10
E	s.c. Applikation einer Suspension von rhSOD inkorporiert in SUV Dosis: of 0,5 ml; Suspension: 1 mg rhSOD/ml	8 von 10
F	s.c. Applikation einer Suspension von rhSOD inkorporiert in IV Dosis: of 0,5 ml; Suspension: 1 mg rhSOD/ml	8 von 10
G	s.c. Applikation einer Suspension von rhSOD inkorporiert in MLV Dosis: of 0,5 ml; Suspension: 3 mg rhSOD/ml	5 von 10
H	s.c. Applikation von 0,5 ml einer IV-Suspension ohne rhSOD	1 von 10
I	i.v. Applikation einer Suspension von rhSOD inkorporiert in SUV Dosis: of 0,5 ml; Suspension: 1 mg rhSOD/ml	9 von 10
J	i.v. Applikation einer Suspension von rhSOD inkorporiert in IV Dosis: of 0,5 ml; Suspension: 1 mg rhSOD/ml	10 von 10
K	i.v. Applikation einer Suspension von rhSOD inkorporiert in MLV Dosis: of 0,5 ml; Suspension: 3 mg rhSOD/ml	4 von 10
L	i.v. Applikation von 0,5 ml einer IV-Suspension ohne rhSOD	1 von 10
M	i.n. Applikation einer Suspension von rhSOD inkorporiert in IV Dosis: of 0,05 ml; Suspension: 1 mg rhSOD/ml	8 von 10
N	Kontrollgruppe ohne Behandlung	1 von 10

Resultat:

Mäuse, die parenteral (s.c., i.v. und i.n.) mit rhSOD in SUV oder IV - Liposomen behandelt wurden, überlebten in den meisten Fällen (Gruppen E, F, I, J, M) im Vergleich mit den Kontrollgruppen, welche entweder überhaupt nicht oder nur mit Liposomen ohne SOD behandelt wurden (Gruppen H, L, und N). Es zeigte sich überraschenderweise ausserdem, dass Mäuse, die mit rhSOD in MLV behandelt wurden, weniger gut gegen die tödliche Influenza-Infektion geschützt waren, obwohl in diesen Liposomenpräparationen eine höhere rhSOD-Menge eingesetzt wurde (Gruppen C, G, und K). Der Grund dafür liegt wahrscheinlich in der Vesikelgrösse (im Bereich von 500 nm; zum Vergleich: IV  $\leq$  ca. 200 nm; SUV  $\leq$  ca. 100 nm), schlechterer Verteilung und geringerer Fusionsfähigkeit der MLV mit den Zellen, wie anhand eines *in vitro*-Fusionsassays festgestellt werden konnte (Fusionsassay: CHO-Zellen wurden über Nacht mit 20  $\mu$ mol rhSOD-hältigen IV und MLV-Liposomen inkubiert, rhSOD wurde durch Immunfluoreszenz nach Behandlung mit 1% Triton X100 detektiert).

Die topische Behandlung der Influenza-infizierten Mäuse mit rhSOD-Gel erzeugte nur einen teilweisen Schutz gegen die tödlichen Folgen der Erkrankung; dennoch war dieser Schutz signifikant in den Gruppen, die mit SUV oder IV-Präparationen (Gruppen A und B) behandelt wurden. Die Resultate zeigen, dass freie Sauerstoffradikale eine bedeutende Rolle in Hinblick auf die tödlichen Auswirkungen der Influenza-Infektion bei Mäusen spielen und dass rhSOD, inkorporiert in kleine liposomale Vesikel (SUV und IV), ein beachtliches therapeutisches Potential gegenüber dieser Virusinfektion besitzt.

Die Resultate zeigen ausserdem, dass rhSOD, inkorporiert in kleine Liposomen (SUV, IV) mit einem Durchmesser von rund 200 nm und darunter, offensichtlich die Hautbarrieren selbst bei im wesentlichen gesunder, intakter Haut überwinden und in tiefere Gewebeschichten penetrieren kann, um so seine schützende Wirkung gegenüber der Virusinfektion im Lungenbereich (Lungenentzündung) zu entfalten. Liposomal inkorporierte rhSOD kann daher nicht nur für i.v., s.c. und i.n. Applikationen, sondern auch in Form von Salben, Gelen, Crèmes oder anderen geeigneten Formulierungen, gegebenenfalls in Kombination mit anderen Wirkstoffen und/oder inklusive weiterer Zusatzstoffe, als ein wirksames Therapeutikum zur Behandlung von



Krankheiten eingesetzt werden, die im Zusammenhang mit freien Sauerstoffradikalen stehen, beispielsweise von - gegebenenfalls mikrobiell verursachten - Entzündungen, insbesondere der oberen Atemwege und der Lunge.

5

**Beispiel 5:** Topische Anwendung bei Herpes labialis

In einem Humanversuch wurde rhSOD, inkorporiert in kleine, unilamellare Vesikeln ("small unilamellar vesicles", SUV) mit einem Vesikeldurchmesser von rund 100 nm oder darunter, gegen eine lokale Hautentzündung im Mundbereich, verursacht durch Fieberbläschen auf der Lippe (herpes labialis), getestet. Herpesinfektionen und Herpeserkrankungen sind bekanntermassen schwierig zu behandeln und für die Betroffenen zumeist sehr unangenehm, da sie häufig Schmerzen (z.B. bei herpes zoster), Jucken, Brennen, Nässeln und/oder kosmetisch unvorteilhafte Auswirkungen, speziell im Gesichtsbereich, verursachen.

Die liposomale rhSOD-Präparation auf Basis des Carbopol®-Gels hatte eine hautcremeartige Konsistenz und wurde in einer Konzentration von rund 0.15 mg rhSOD pro cm<sup>2</sup> Behandlungsfläche ein- bis zweimal pro Tag direkt auf den entzündeten Bereich aufgetragen. Bereits nach der ersten Anwendung zeigte sich innerhalb weniger Stunden eine spürbare Erleichterung und schon nach 3-tägiger Behandlung waren die typischen Symptome weitestgehend abgeklungen.

25

**Beispiel 6:** Topische Anwendung gegen Allergie

Dieselbe rhSOD-Präparation wie in Beispiel 5 wurde in einem anderen Humanversuch gegen allergische Reaktionen der Haut getestet. Die Allergiesymptome waren gerötete Augen und Schwellungen rund um die Augen und im Bereich zwischen Augen und Nase, möglicherweise als zusätzliche Auswirkungen einer bestehenden Heuschnupfenallergie. Neben den durch die Schwellungen verursachten unangenehmen Spannungen im Gesicht und dem zusätzlich damit verbundenen psychologischen Leidensdruck war ausserdem eine Beeinträchtigung des normalen Sehens gegeben.

35

Das rhSOD-Gel wurde, analog zu Beispiel 5, in einer Konzentration von ca. 0.15 mg rhSOD pr cm<sup>2</sup> Behandlungsfläche im gesamten betroffenen

Gesichtsbereich wie ein Hautcreme aufgetragen. Das Ergebnis war beeindruckend: Bereits nach einmaligem Auftragen gingen die Schwellungen fast vollständig zurück; sicherheitshalber wurde am darauf folgenden Tag zwar noch ein zweites Mal eingecremt, eine weitere Behandlung war jedoch nicht mehr nötig. Die Beschwerden sind praktisch vollständig abgeklungen.

**Beispiel 7:** Anwendung gegen Psoriasis

In einem weiteren Versuch wurde das rhSOD-Gel aus Beispiel 5 an einem kindlichen Patienten gegen Psoriasis eingesetzt. Das Präparat wurde, analog zu Beispiel 5, in einer Konzentration von ca. 0.15 mg rhSOD pro cm<sup>2</sup> Behandlungsfläche an allen betroffenen Körperstellen 2x täglich (am Morgen und am Abend) wie eine Hautcreme aufgetragen.

**Resultat:** Nach drei Tagen Behandlung zeigte sich ein deutlicher Rückgang der Hautrötungen im Bereich der Entzündungsherde sowie eine Verminderung des Juckreizes. Dieser erfreuliche Befund zeigt, dass rhSOD in Liposomen bei externer topischer Applikation auch bei Psoriasis-Patienten - wenn schon nicht zur Heilung der Krankheit - so doch zumindest zur Linderung der Symptome erfolgreich eingesetzt werden kann.

## Patentansprüche

1. Verwendung von rekombinanter humaner SOD (rhSOD) in Liposomen, in Mischung mit Hyaluronsäure und/oder mindestens einem physiologisch akzeptablen Träger, sowie gegebenenfalls weiteren Zusätzen, für die Herstellung einer pharmazeutischen Zubereitung zur prophylaktischen und/oder therapeutischen Anwendung gegen erhöhte Konzentrationen an Superoxidradikalen und/oder dadurch verursachte Schädigungen.
2. Verwendung von SOD, vorzugsweise rekombinanter humaner SOD (rhSOD) in Liposomen, gegebenenfalls in Mischung mit Hyaluronsäure und/oder mindestens einem physiologisch akzeptablen Träger, sowie gegebenenfalls weiteren Zusätzen, für die Herstellung einer pharmazeutischen Zubereitung zur prophylaktischen und/oder therapeutischen, äusserlichen Anwendung gegen - vorzugsweise durch Einwirkung von UV-Strahlung und/oder ionisierende Strahlung verursachte - Strahlenschädigungen der Haut und benachbarter Gewebe, bei Verbrennungen, Verbrühungen und entzündlichen Hauterkrankungen.
3. Verwendung von SOD, vorzugsweise rhSOD in Liposomen, in Mischung mit Hyaluronsäure und gegebenenfalls mindestens einem physiologisch akzeptablen Träger und/oder weiteren Zusätzen, für die Herstellung einer pharmazeutischen Zubereitung zur prophylaktischen und/oder therapeutischen Anwendung gegen - vorzugsweise durch Einwirkung von UV-Strahlung und/oder ionisierende Strahlung verursachte - Strahlenschädigungen der Haut und benachbarter Gewebe, bei Verbrennungen, Verbrühungen und entzündlichen Hauterkrankungen.
4. Verwendung von rekombinanter humaner SOD (rhSOD) in Liposomen, gegebenenfalls in Mischung mit Hyaluronsäure und /oder mindestens einem physiologisch akzeptablen Träger und/oder weiteren Zusätzen, für die Herstellung einer pharmazeutischen Zubereitung zur therapeutischen und/oder prophylaktischen Anwendung gegen Entzündungen, entzündliche Prozesse, sowie rheumatisch-arthritische Erkrankungen.
5. Verwendung von SOD in Liposomen, vorzugsweise rekombinanter humaner SOD (rhSOD), gegebenenfalls in Mischung mit Hyaluronsäure und/oder mindestens einem physiologisch akzeptablen Träger, sowie

gegebenenfalls weiteren Zusätzen, für die Herstellung einer Zubereitung zur Verbesserung der Haltbarkeit von organischen, vorzugsweise biogenen, Materialien.

- 5 6. Verwendung von SOD, vorzugsweise rekombinanter humaner SOD (rhSOD) in Liposomen, in Mischung mit Hyaluronsäure und/oder mindestens einem physiologisch akzeptablen Träger, sowie gegebenenfalls weiteren Zusätzen, für die Herstellung einer Zubereitung zur Verbesserung der Haltbarkeit von organischen, vorzugsweise biogenen, Materialien.  
10
7. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die pharmazeutische Zubereitung ausserdem auf eine, vorzugsweise sterile, Wundabdeckung aufgebracht wird, insbesondere zur raschen und einfachen Behandlung und/oder Selbst-  
15 Behandlung bei kleineren und mittelgrossen Brandwunden, äusserlichen Entzündungen und rheumatischen Gelenkentzündungen.
8. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass die pharmazeutische Zubereitung ausserdem durch  
20 Aufsprühen aus einer Sprühflasche oder einer sonstigen Sprühvorrichtung appliziert wird.
9. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass zur Zubereitung ausserdem mindestens ein  
25 strahlenfilterndes oder strahlenabsorbierendes Schutzmittel, vorzugsweise ein Lichtfilter oder UV-Absorber, insbesondere ein UVB-Filter, sowie gegebenenfalls weitere, vorzugsweise hautpflegende Faktoren, dazugemischt werden.
- 30 10. Verwendung nach Anspruch 1 oder 4 für die Herstellung einer pharmazeutischen Zubereitung zur Anwendung gegen rheumatische Gelenkentzündungen und/oder Osteoarthritis.
- 35 11. Verwendung nach Anspruch 1 oder 4 für die Herstellung einer pharmazeutischen Zubereitung zur Anwendung, vorzugsweise per Inhalation, gegen Entzündungen der Atemwege und der Lunge, insbesondere gegen Bronchitis, Schocklunge (ARDS) und/oder Lungenemphysem.

- 27 -

12. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 4 für die Herstellung einer pharmazeutischen Zubereitung zur Anwendung gegen lokale Entzündungen der Haut, Hautempyse, Furunkeln oder Akne.
- 5 13. Verwendung nach Anspruch 1, 5 oder 6 für die Herstellung einer Zubereitung zur Anwendung bei organischen Geweben, insbesondere tierischen Geweben, Organen, und Organ- bzw. Gewebetransplantaten.
- 10 14. Verwendung nach Anspruch 1, 5 oder 6 für die Herstellung einer Zubereitung zur Anwendung bei Lebensmitteln, vorzugsweise leichtverderblichen Fleisch- und Molkereiprodukten.
- 15 15. Verwendung nach Anspruch 1, 5 oder 6 für die Herstellung einer Zubereitung zur Verbesserung der Haltbarkeit von kosmetischen Präparaten auf organischer Basis, vorzugsweise von Hautpflegemitteln, insbesondere von Salben, Crèmes, Gelen, Wässern, Ölen, Lotions und dergleichen.
- 20 16. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die SOD für äusserliche Anwendungen - vorzugsweise als Salbe, Crème, oder Gel - in einer Dosis von 0.01-1 mg/cm<sup>2</sup> behandelte Körperoberfläche, für orale oder parenterale Applikationen - vorzugsweise als Suspension - in einer Dosis von 0.5-50 mg/kg Körpergewicht eingesetzt wird.
- 25 17. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche mit einem physiologisch akzeptablen Träger, dadurch gekennzeichnet, dass ein fettarmer oder fettfreier Träger, vorzugsweise aus der Gruppe der organischen und anorganischen Hydrogele, eingesetzt wird.
- 30 18. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die SOD in einer Konzentration von grösser oder gleich 0.01 Gew.%, insbesondere von 0.01 bis 5 Gew.%, der Zubereitung verwendet wird.
- 35 19. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche mit Hyaluronsäure, dadurch gekennzeichnet, dass die Hyaluronsäure in einer

Konzentration von grösser oder gleich 0.05 Gew. %, insbesondere von 0.1 bis 5 Gew. %, der Zubereitung eingesetzt wird.

20. Verfahren zur Verbesserung der Haltbarkeit von organischen, vorzugsweise biogenen, Materialien, dadurch gekennzeichnet, dass eine Zubereitung, welche SOD, vorzugsweise rekombinante humane SOD (rhSOD) in Liposomen, und Hyaluronsäure sowie gegebenenfalls mindestens einen physiologisch akzeptablen Träger und/oder weitere Zusätze enthält, mit dem organischen Material zumindest teilweise in Kontakt gebracht wird.
21. Verfahren zur Verbesserung der Haltbarkeit von organischen, vorzugsweise biogenen, Materialien, dadurch gekennzeichnet, dass eine Zubereitung, welche rekombinante humane SOD (rhSOD) in Liposomen und gegebenenfalls Hyaluronsäure und/oder mindestens einen physiologisch akzeptablen Träger, sowie gegebenenfalls weitere Zusätze enthält, mit dem organischen Material zumindest teilweise in Kontakt gebracht wird.
22. Verfahren nach Anspruch 20 oder 21, dadurch gekennzeichnet, dass die Zubereitung flüssig ist und mittels einer Sprühvorrichtung auf das organische Material aufgesprüht wird.
23. Verfahren nach Anspruch 20 oder 21, dadurch gekennzeichnet, dass die Zubereitung flüssig ist und das organische Material in die flüssige Zubereitung eingetaucht oder eingelegt wird.
24. Verfahren nach einem der Ansprüche 20 bis 23, dadurch gekennzeichnet, dass die Zubereitung zur Verbesserung der Haltbarkeit von tierischen oder pflanzlichen Geweben, vorzugsweise Organen, Organtransplantaten, Gewebetransplantaten und/oder Lebensmitteln, insbesondere leichtverderblichen Fleisch- und Molkereiprodukten, verwendet wird.
25. Verfahren nach Anspruch 20 oder 21, dadurch gekennzeichnet, dass die Zubereitung flüssig ist und das organische Material, vorzugsweise Organe und Organtransplantat, mit der Zubereitung nach üblichen Methoden der Organkonservierung, insbesondere durch Injektion oder Infusion, gespült wird.

26. Verfahren nach Anspruch 20 oder 21, dadurch gekennzeichnet, dass die Zubereitung zu organischem Material in einem kosmetischen Präparat hinzugefügt wird.
- 5
27. Verfahren nach einem der Ansprüche 20 bis 26 mit mindestens einem physiologisch akzeptablen Träger in der Zubereitung, dadurch gekennzeichnet, dass ein fettarmer oder fettfreier Träger, vorzugsweise aus der Gruppe der organischen und anorganischen Hydrogele, verwendet wird.
- 10
28. Verfahren nach einem der Ansprüche 20 bis 27, dadurch gekennzeichnet, dass die SOD in einer Konzentration von grösser oder gleich 0.01 Gew.%, insbesondere von 0.01 bis 5 Gew.%, der Zubereitung eingesetzt wird.
- 15
29. Verfahren nach einem der Ansprüche 20 bis 28 mit Hyaluronsäure in der Zubereitung, dadurch gekennzeichnet, dass Hyaluronsäure in einer Konzentration von grösser oder gleich 0.05 Gew.%, insbesondere von 0.1 bis 5 Gew.%, der Zubereitung verwendet wird.
- 20
30. Verfahren nach einem der Ansprüche 20 bis 29, dadurch gekennzeichnet, dass die SOD in einer Menge von 0.1 - 100 mg/kg organisches Material angewendet wird.
- 25
31. Verwendung nach Anspruch 1 oder 4 zur Herstellung einer pharmazeutischen Zubereitung zur Anwendung gegen mikrobiell, insbesondere durch Viren, verursachte Entzündungen.
- 30
32. Verwendung nach Anspruch 31 zur Herstellung einer pharmazeutischen Zubereitung zur Anwendung gegen Entzündungen, die durch Influenzavirus verursacht werden, insbesondere im Bereich der Atemwege und der Lunge.
- 35
33. Verwendung nach Anspruch 31 zur Herstellung einer pharmazeutischen Zubereitung zur Anwendung gegen Entzündungen, die durch Herpesvirus verursacht werden, insbesondere im Bereich von Mund und Lippen (herpes labialis).

- 30 -

34. Verwendung nach Anspruch 1 oder 4 zur Herstellung einer pharmazeutischen Zubereitung zur Anwendung gegen - insbesondere allergisch bedingte - Rötungen und Schwellungen der Haut.
- 5 35. Verwendung nach Anspruch 1 oder 4 zur Herstellung einer pharmazeutischen Zubereitung zur - vorzugsweise externen, topischen - Anwendung gegen Psoriasis.
- 10 36. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 6 mit SOD, vorzugsweise rhSOD, in Liposomen, wobei die Liposomen eine durchschnittliche Grösse von weniger als 600 nm, vorzugsweise weniger als 300 nm, insbesondere weniger als 150 nm, aufweisen.
- 15 37. Verwendung nach Anspruch 36, dadurch gekennzeichnet, dass die Liposomen unilamellar sind.



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 95/04352

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 6 A61K38/44 A23L1/015

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 A61K A23L

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>DATABASE WPI Week 8820 Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 88-136325 &amp; JP,A,63 077 824 (TOYO SODA MFG KK) , 8 April 1988 see abstract</p>	2,10,17
X	<p>--- C.R. SEANCES SOC. BIOL. FIL., vol. 179, no. 4, 1985 pages 429-439, A.M. MICHELSON ET AL. 'La superoxide dismutase et la pathologie des radicaux libres.' see page 435 - page 436 ---</p>	2,12
	-/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents:

- 'A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- 'E' earlier document but published on or after the international filing date
- 'L' document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- 'O' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- 'P' document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- 'T' later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- 'X' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- 'Y' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- '&' document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

14 March 1996

Date of mailing of the international search report

22.03.96

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Klaver, T

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP 95/04352

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>DATABASE WPI Week 9320 Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 93-164366 &amp; JP,A,05 097 694 (DENKI KAGAKU KOGYO KK) , 20 April 1993 see abstract</p> <p style="text-align: center;">---</p>	2,3,17
X	<p>DATABASE WPI Week 9006 Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 90-041606 &amp; JP,A,01 319 427 (MIZUSHIMA) , 25 December 1989 see abstract</p> <p style="text-align: center;">---</p>	2,3,8, 12,18
X	<p>EP,A,0 207 039 (OLEOFINA SA) 30 December 1986 see claims</p> <p style="text-align: center;">---</p>	21,24
A	<p>EP,A,0 457 910 (JAPAN TOBACCO INC.) 27 November 1991</p> <p style="text-align: center;">---</p>	
Y	<p>AM. REV. RESPIR DIS., vol. 132, no. 1, 1985 pages 164-167, XP 000566027 R.V. PADMANABHAN ET AL. 'Protection against pulmonary oxygen toxicity in rats by the intratracheal administration of liposome-encapsulated superoxide dismutase or catalase.' see the whole document</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1,11
Y	<p>WO,A,87 01387 (SYN-TEK AB) 12 March 1987 see page 20 - page 28; examples 7-14</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1,11
A	<p>BULL. CANCER, vol. 80, no. 9, 1993 pages 799-807, J.L. LEFAIX ET AL. 'La fibrose cutané-musculaire radio-induite: efficacité thérapeutique majeure de la superoxide dismutase Cu/Zn liposomiale.'</p> <p style="text-align: center;">---</p>	
A	<p>DERMATOLOGICA, vol. 179, no. SP.1, 1989 pages 101-106, Y. NIWA 'Lipid peroxides and superoxide dismutase (SOD) induction in skin inflammatory diseases, and treatment with SOD preparations.'</p> <p style="text-align: center;">---</p>	
	-/--	

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Patent Application No.

PCT/EP 95/04352

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>AM. REV. RESPIR. DIS., vol. 131, no. 4, 1985 pages 633-637, XP 000565349 R.J. McDONALD ET AL. 'Effect of superoxide dismutase encapsulated in liposomes or conjugated with polyethylene glycol on neutrophil bactericidal activity in vitro and bacterial clearance in vivo.'</p> <p>---</p>	
A	<p>EUR.J. DERMATOL., vol. 4, no. 5, 1994 pages 389-393, XP 000565353 A.A.YOUSSEFI ET AL. 'Oxyradical involvement in puva-induced skin reactions. Protection by local application of SOD.'</p> <p>---</p>	
A	<p>FREE RADICAL BIOLOGY &amp; MEDICINE, vol. 16, no. 6, 1994 pages 821-824, XP 000565354 D.B. JACOBY ET AL. 'Influenza virus induced expression of antioxidant genes in human epithelial cells.'</p> <p>---</p>	
A	<p>DRUGS EXP. CLIN. RES., vol. 17, no. 2, 1991 pages 127-131, XP 000565350 Y. MIZUSHIMA ET AL. 'Topical application of superoxide dismutase cream.'</p> <p>-----</p>	

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 95/04352

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A-0207039	30-12-86	LU-A- 85910	05-12-86
		CA-A- 1281674	19-03-91
		JP-A- 61271959	02-12-86
		US-A- 5010007	23-04-91
		US-A- 4957749	18-09-90
-----			
EP-A-0457910	27-11-91	JP-A- 4159216	02-06-92
		CA-A- 2045550	10-05-91
		WO-A- 9107416	30-05-91
		WO-A- 9206987	30-04-92
		KR-B- 9400166	08-01-94
		US-A- 5304380	19-04-94
		JP-A- 3218389	25-09-91
-----			
WO-A-8701387	12-03-87	AU-B- 598756	05-07-90
		AU-B- 6370886	24-03-87
		DE-A- 3682505	19-12-91
		EP-A, B 0236385	16-09-87
		IE-B- 59078	12-01-94
		IL-A- 79926	07-10-94
		JP-T- 63501473	09-06-88
		SU-A- 1779263	30-11-92
		US-A- 5472691	05-12-95
		US-A- 5130245	14-07-92
		US-A- 5248603	28-09-93
-----			

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PC1/EP 95/04352

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
IPK 6 A61K38/44 A23L1/015

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 A61K A23L

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	DATABASE WPI Week 8820 Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 88-136325 & JP,A,63 077 824 (TOYO SODA MFG KK) , 8.April 1988 siehe Zusammenfassung ---	2,10,17
X	C.R. SEANCES SOC. BIOL. FIL., Bd. 179, Nr. 4, 1985 Seiten 429-439, A.M. MICHELSON ET AL. 'La superoxide dismutase et la pathologie des radicaux libres.' siehe Seite 435 - Seite 436 --- -/-	2,12

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

'A' Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

'E' älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

'L' Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

'O' Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

'P' Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

'T' Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

'X' Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

'Y' Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

'Z' Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

14. März 1996

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

22.03.96

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+ 31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Klaver, T

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen  
PCI/EP 95/04352

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>DATABASE WPI Week 9320 Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 93-164366 &amp; JP,A,05 097 694 (DENKI KAGAKU KOGYO KK) , 20.April 1993 siehe Zusammenfassung</p> <p>---</p>	2,3,17
X	<p>DATABASE WPI Week 9006 Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 90-041606 &amp; JP,A,01 319 427 (MIZUSHIMA) , 25.Dezember 1989 siehe Zusammenfassung</p> <p>---</p>	2,3,8, 12,18
X	<p>EP,A,0 207 039 (OLEOFINA SA) 30.Dezember 1986 siehe Ansprüche</p> <p>---</p>	21,24
A	<p>EP,A,0 457 910 (JAPAN TOBACCO INC.) 27.November 1991</p> <p>---</p>	
Y	<p>AM. REV. RESPIR DIS., Bd. 132, Nr. 1, 1985 Seiten 164-167, XP 000566027 R.V. PADMANABHAN ET AL. 'Protection against pulmonary oxygen toxicity in rats by the intratracheal administration of liposome-encapsulated superoxide dismutase or catalase.' siehe das ganze Dokument</p> <p>---</p>	1,11
Y	<p>WO,A,87 01387 (SYN-TEK AB) 12.März 1987 siehe Seite 20 - Seite 28; Beispiele 7-14</p> <p>---</p>	1,11
A	<p>BULL. CANCER, Bd. 80, Nr. 9, 1993 Seiten 799-807, J.L. LEFAIX ET AL. 'La fibrose cutané-musculaire radio-induite: efficacité thérapeutique majeure de la superoxide dismutase Cu/Zn liposomiale.'</p> <p>---</p>	
A	<p>DERMATOLOGICA, Bd. 179, Nr. SP.1, 1989 Seiten 101-106, Y. NIWA 'Lipid peroxides and superoxide dismutase (SOD) induction in skin inflammatory diseases, and treatment with SOD preparations.'</p> <p>---</p>	

-/--

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>AM. REV. RESPIR. DIS., Bd. 131, Nr. 4, 1985 Seiten 633-637, XP 000565349 R.J. MCDONALD ET AL. 'Effect of superoxide dismutase encapsulated in liposomes or conjugated with polyethylene glycol on neutrophil bactericidal activity in vitro and bacterial clearance in vivo.' ---</p>	
A	<p>EUR.J. DERMATOL., Bd. 4, Nr. 5, 1994 Seiten 389-393, XP 000565353 A.A.YOUSSEFI ET AL. 'Oxyradical involvement in puva-induced skin reactions. Protection by local application of SOD.' ---</p>	
A	<p>FREE RADICAL BIOLOGY &amp; MEDICINE, Bd. 16, Nr. 6, 1994 Seiten 821-824, XP 000565354 D.B. JACOBY ET AL. 'Influenza virus induced expression of antioxidant genes in human epithelial cells.' ---</p>	
A	<p>DRUGS EXP. CLIN. RES., Bd. 17, Nr. 2, 1991 Seiten 127-131, XP 000565350 Y. MIZUSHIMA ET AL. 'Topical application of superoxide dismutase cream.' -----</p>	

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 95/04352

101/EP 93/04352

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP-A-0207039	30-12-86	LU-A- 85910	05-12-86
		CA-A- 1281674	19-03-91
		JP-A- 61271959	02-12-86
		US-A- 5010007	23-04-91
		US-A- 4957749	18-09-90
-----			
EP-A-0457910	27-11-91	JP-A- 4159216	02-06-92
		CA-A- 2045550	10-05-91
		WO-A- 9107416	30-05-91
		WO-A- 9206987	30-04-92
		KR-B- 9400166	08-01-94
		US-A- 5304380	19-04-94
		JP-A- 3218389	25-09-91
-----			
WO-A-8701387	12-03-87	AU-B- 598756	05-07-90
		AU-B- 6370886	24-03-87
		DE-A- 3682505	19-12-91
		EP-A, B 0236385	16-09-87
		IE-B- 59078	12-01-94
		IL-A- 79926	07-10-94
		JP-T- 63501473	09-06-88
		SU-A- 1779263	30-11-92
		US-A- 5472691	05-12-95
		US-A- 5130245	14-07-92
		US-A- 5248603	28-09-93
-----			